

昆虫神经毒素的研究: DDT 对美洲 蜚蠊 L-酪氨酸脱羧酶的诱导作用

罗 远 倪逸声 张宗炳

(北京大学生物系)

摘要 本文选择美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 作为材料, 采用放射性同位素标记及放射自显影技术, 观察 DDT 中毒蜚蠊体内 L-酪氨酸脱羧酶的变化, 结果表明, DDT 具有诱导酪氨酸脱羧酶活性的作用。用加入放线菌素-D 及环己亚胺的方法, 证明诱导控制在转录水平。还发现, 这一诱导作用伴随着血淋巴中 cAMP 量的增加。根据 DDT 的诱导效应只在活体内发生, 离体情况下不发生这种情况, 以及连续的电刺激也可诱导毒素产生等现象, 作者等提出 DDT 的物理诱导假说。

关键词 昆虫神经毒素 酪胺 美洲蜚蠊 酪氨酸脱羧酶 环腺苷酸

前 言

在前一篇论文(张宗炳等, 1983)中, 我们报道了在美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 血淋巴中因 DDT 中毒后产生的一种神经毒素, 经鉴定结果认为是酪胺, 或主要是酪胺(可能有部分苯乙胺)。本文报道这一毒素产生的机制, 从生理反应估计, 酪胺是由酪氨酸脱羧形成, 因此研究了蜚蠊体内的酪氨酸脱羧酶, 以及 DDT 对此酶的诱导机制。

材 料 与 方 法

一、试验昆虫

试虫是在 25℃ 恒温培养箱内饲养的美洲蜚蠊成虫。

二、DDT 处理

每 20 只成虫为一组, 分别点滴 4 μ l p, p'-DDT 丙酮溶液 (100 μ g/10 μ l) 于前胸背板, 另 20 只作为对照组。张宗炳等(1983)已证明丙酮不能引起神经毒素的产生, 点药后, 立即放入 30℃ 恒温培养箱中, 12 小时后转移至 15℃ 中, 经 0.5 小时以液氮固定待用。

另组在用 DDT 处理前, 将放线菌素-D 及环己亚胺分别注入昆虫腹腔, 然后按上述步骤进行 DDT 处理。

三、试样和匀浆制备

制备了血淋巴试样及神经索匀浆。用离心方法提取血淋巴液, 再以 1:1 比例与抗坏血酸制成试样。

神经索 首先在冰浴中取出胸腹部神经索, 加少量蔗糖液于玻璃匀浆器中匀浆。

四、酪氨酸脱羧酶活性的测定

参照 Murdock 和 Wirtz (1973) 及 Hopkins 和 Murdock (1976) 的方法并加修改。用标记的底物与酶反应, 后用薄膜层析及液体闪烁计数测定生成的产物, 作为酶活力。

取上述提取液(血淋巴或神经)样品 $100\mu\text{l}$, 按次加入 Tris 缓冲液、5-磷酸吡哆醛、抗坏血酸, 然后将各管充氮气 3 分钟, 最后加入标记的底物 ^3H -3.5-酪氨酸(总强度为 $10\mu\text{Ci}$, $43\text{Ci}/\text{mmol}$), 以后保温, 反应液的总体积为 0.4ml 。酶的反应在 37°C 进行 12 小时, 反应后的混合物选用微晶型纤维素膜($20 \times 20\text{cm}$)进行薄膜层析, 分离 ^3H -酪胺。层析系统为: 正丁醇: 甲醇: 1N 甲酸 ($\text{V}/\text{V}/\text{V}$ 60:20:20)。层析后以 0.5% 茚三酮显色, 再参照标准酪胺的斑点, 将样品中的相应点剪下, 置于盛有 $10\mu\text{l}$ 闪烁液的计数瓶中(闪烁液组成: ppo 4 克, popop 0.1 克, 甲苯 1,000 ml) 在 Packard 460 CD 型液体闪烁计数仪上进行测定。

酶的匀浆液经 Folin 酚方法测定总蛋白含量, 酶活力表示为: 每毫克蛋白, 每小时的计数 ($\text{cpm}/\text{hr}/\text{mg}$ 蛋白)。

放射自显影观察, 将层析后的纤维素膜与乳胶片对贴, 扎紧, 放入干冷的冰箱中曝光, 曝光后将乳胶片分开, 并行显影、定影、制成放射自显片。

五、以蛋白结合法测定血淋巴中 cAMP 含量

用蛋白结合法测 cAMP, 是根据蛋白激酶与标记的及非标记的 cAMP 产生竞争结合的原理。当反应系统中激酶与 ^3H -cAMP 的量一定时, 通过测定 ^3H -cAMP 激酶的复合物, 可求得样品中非标记的 cAMP 的含量。

标记的 cAMP (式样品) 先后加入 ^3H -cAMP 与蛋白激酶, 放置于 $0-4^\circ\text{C}$ 反应 4 小时, 反应后加入吸附剂并离心 ($3,000$ 转/分, 6 分钟), 分离混合物中欲测的 ^3H -cAMP-激酶, 离心后取 $200\mu\text{l}$ 置于计数瓶, 加入闪烁液测放射性。

由各管计数求得结合率 (C_0/C_x , C_0 —无标准 cAMP 和样品的计数; C_x —加入标准 cAMP 和样品后的计数)。以 C_0/C_x 对标准 cAMP 的含量 (pmol) 作出标准曲线, 未知样品则通过测定结合率, 在标准曲线上查得相应的 cAMP 含量, 经 Folin 酚测定蛋白含量, 换算为: $\text{cAMP}(\text{pmol})/\text{mg}$ 蛋白。

六、酪氨酸脱羧酶的初步分离纯化

上述提取的血淋巴液经低温离心 ($10,000$ 转/分), 做成上柱样品, 选用 Sepharose-6B ($1 \times 70\text{cm}$) 进行层析分离。用 0.1M , $\text{pH}7.4$ 磷酸缓冲液洗脱, 洗脱以 LKB 紫外监测仪记录, 分出的峰分别收集, 并经浓缩后, 按方法四测定各峰的酪氨酸脱羧酶活性。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析活性峰的蛋白成分。

结 果

一、酪氨酸脱羧酶的活性

薄膜层析法的结果表示, 大部分标记的底物 ^3H -酪氨酸已转化为 ^3H -酪胺, 换算为酶的活性 ($\text{cpm}/\text{hr}/\text{mg}$ 蛋白) 如表 1 所示。正常情况下酪氨酸脱羧酶在蚌血淋巴及神经索中均存在, DDT 处理后, 酪氨酸脱羧酶增多, 约提高一倍左右。

不同作用时间的酶活力曲线, 是将 DDT 处理后的昆虫放入 35°C , 12 小时后转入 15°C , 开始计时, 分别在 0、0.5、1.0、2.5、5.0 小时以液氮固定。然后测酶的活性, 以酶活力

表1 DDT对酪氨酸脱羧酶的诱导作用

Table 1 DDT induction of tyrosine decarboxylase

酶原 Enzyme source	酪氨酸脱羧酶活性 Activity of tyrosine decarboxylase		
	对 照 control	DDT 处理 DDT treated	倍 数 ratio (induction effect)
血 淋 巴 Haemolymph	26.4±3.2	49.2±8.8	1.86
神 经 索 nerve cord	35.1±10.4	65.6±2.4	1.87

对 DDT 作用时间作图,绘出 DDT 不同作用时间的酶活力曲线(图 1)。图 1 表明,DDT 的作用时间不同,对酪氨酸脱羧酶的诱导也不同,在 DDT 作用后 1—1.5 小时,诱导作用最为显著。

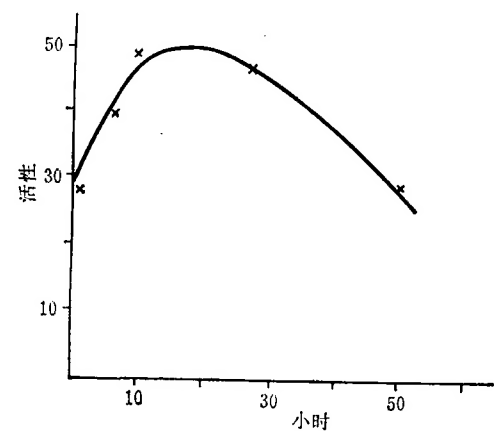


图1 DDT 不同作用时间的酪氨酸脱羧酶活力

Figure 1 Tyrosine decarboxylase activity at different times after DDT treatment

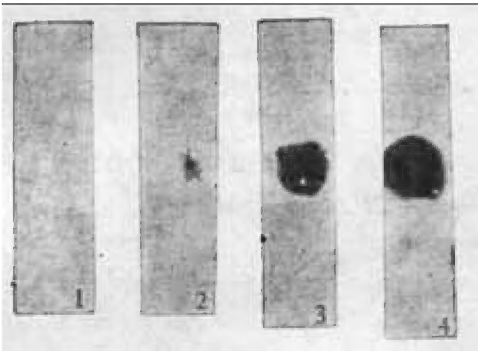


图2 ³H 酪胺的放射自显影

1.标准酪胺 2.对照 3.DDT 处理(保温8小时) 4.DDT 处理(保温十小时)

Figure 2 Autoradiograph of ³H tyramine

1. tyramine sample, 2. control 3. DDT treated (8 hours incubation) 4. DDT treated (10 hours incubation)

对层析后的纤维素膜进行放射自显影观察,以显示标记的产物³H酪胺的位置及放射性。图2表明,匀浆中存在的酪氨酸脱羧酶已将标记的底物³H-酪氨酸转化为酪胺。根据³H酪胺的放射活性不同可看出,DDT处理后,³H酪胺的量在增加,即酪氨酸脱羧酶的活性提高。

二、DDT 的诱导水平

加入 mRNA 及蛋白质合成的抑制剂,观察 DDT 的诱导水平。在用 DDT 进行处理前,加入放线菌素-D(0.1μg/虫),然后观察 DDT 的诱导效应(表 2)。结果表明,加抑制剂后,DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应消失。可见 DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用是控制在转录水平上的,与合成新的 mRNA 及蛋白质有关。

表 2 对酪氨酸脱羧酶 DDT 诱导水平
Table 2 Tyrosine decarboxylase induction level of DDT

酶 原 Enzyme source	酪氨酸脱羧酶活性 Activity of tyrosine decarboxylase			
	对 照 control	DDT 处理 DDT treated	DDT 处理加放线菌素 D. DDT treated + actinomycin	DDT 处理加环己亚胺 DDT treated + cycloheximide
血 淋 巴 Haemolymph	22±2.4	38.4±5.3	22.3±3.4	60.4±3.5
神 经 索 Nerve cord	40.2±9.3	74.8±2.5	11.7±2.1	197±25.3

三、DDT 处理及对照组酪氨酸脱羧酶的米氏常数 (K_m) 值的比较。

参照 Murdock 和 Wirtz (1973) 及 Bulger 和 Kupfer (1978) 的工作,测定酪氨酸脱羧酶的米氏常数和最大速度,将 DDT 处理组及对照组的酶匀浆液,分别与不同浓度的底物, ³H 酪氨酸, 保温测定酪氨酸脱羧酶的活力,并用双倒数法作出两条动力学曲线,如图 3。图 3 的结果表明, DDT 处理组与对照组样品相比,酶的 K_m 值不变,但 V_{max} 有改变,此结果进一步说明, DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用,不是改变酶的结构,而是合成了新蛋白质,使酶的量增加。

四、DDT 诱导作用的体内、体外实验

体内实验步骤同前,用 DDT 处理昆虫后,制备酶匀浆并测定酶的活性。体外实验是将未用 DDT 处理的酶匀浆,保温前加入相应量的 DDT,反应后测酶的活性。两种处理方法测定的酶活力进行比较(如表 3),结果表明, DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用只在体内条件下发生,在离体情况下不出现这种效应,可能与细胞膜的完整性,以及膜上的受体有关。

表 3 DDT 诱导作用在体内及体外的比较
Table 3 DDT induction in vivo vs. in vitro

处 理 方 法 treatment	酪氨酸脱羧酶活性 activity of tyrosine decarboxylase
对 照 control	78.9
DDT 处理体内 +DDT in vivo	153.5
DDT 处理体外 +DDT in vitro	81.9

注:表中为一次结果的数据,得到两次结果,但差异较大,未做平均,但两次的趋势是一致的。

五、DDT 处理后血淋巴中 cAMP 的变化

采用蛋白结合测定法测定 cAMP 含量,其结果见图 4 及表 4。从六次测试结果来看, DDT 处理后, cAMP 含量有较为明显的增加趋势,约增加 1—1.5 倍左右。这六次结果差异也较大,但总的趋势都一致,说明试验条件可能未控制好。就总的看来, cAMP 的增加是肯定的,这一结果与 DDT 处理后,酪氨酸脱羧酶活性的增高是相应的。

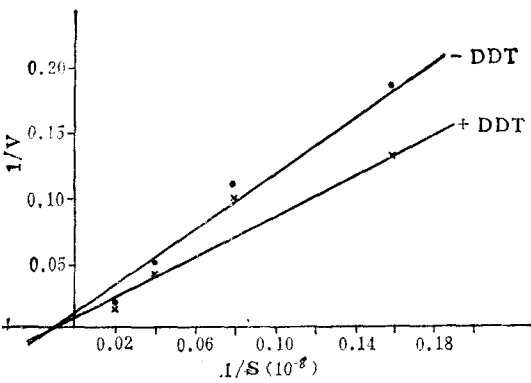


图 3 显示酪氨酸脱羧酶 K_m 及 V_{max} 的双倒数曲线(处理组及对照比较)

Figure 3 Double reciprocal curve showing K_m and V_{max} of tyrosine decarboxylase from normal and DDT-treated cockroaches.

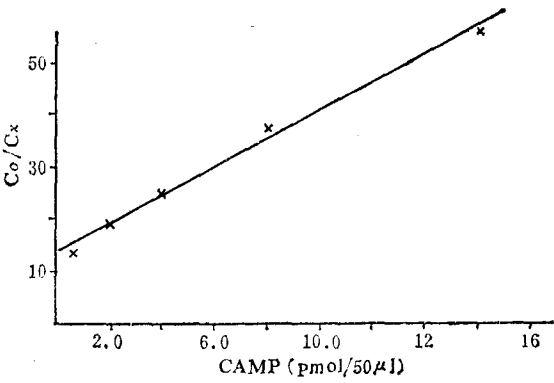


图 4 cAMP 的标准曲线

Figure 4 Standard curve for cAMP

表 4 DDT 处理后 cAMP 的改变

Table 4 Changes of cAMP after DDT treatment

实验次数 Experiment	cAMP (p mol/mg protein)		
	对 照 - DDT	DDT 处理 + DDT	倍 数 ratio
1	2.17	3.26	1.50
2	1.42	2.58	1.82
3	1.52	2.33	1.53
4	1.07	1.66	1.55
5	0.62	1.60	2.58
6	0.62	1.29	2.08
average	1.15±0.5	2.01±0.6	1.75

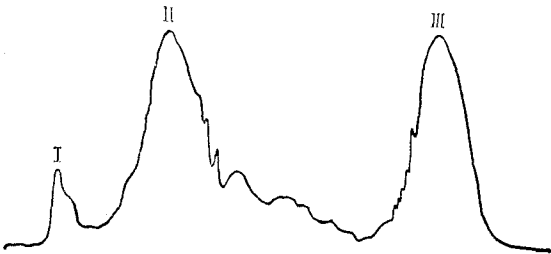


图 5 Sepharose 6B 分离酪氨酸脱羧酶的各峰

Figure 5 Isolation of tyrosine decarboxylase by Sepharose 6B, showing three peaks

六、酪氨酸脱羧酶的初步分离、纯化和鉴定

采用 Sepharose-6B 对提取的酶匀浆进行柱层析,分离出三个主要的峰(图 5)。收集各峰管,分别测定酪氨酸脱羧酶的活力(表 5)。测定结果是,仅第三峰有酪氨酸脱羧酶活

力,同时得出,经此方法一次提纯后,酶的活力提高约 9.95 倍。

表 5 层析后各峰的酪氨酸脱羧酶的活性

Table 5 Activity of tyrosine decarboxylase of the three peaks after isolation

峰 Peak	酪氨酸脱羧酶活性 Activity of tyrosine decarboxylase (cpm/hr/mg protein)	提 纯 倍 数 Purification (times)
层 析 前 Before isolation	29.5	
峰 I Peak I	61.7	
峰 II Peak II	67.8	
峰 III Peak III	292.8	9.95

用各峰蛋白作凝胶电泳进行鉴定时,得电泳图谱如图 6。

活性峰 (III) 仍有三条带,说明尚有待进一步提纯。

讨 论

一、DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用

继 Sternburg 等(1952, 1964)发现神经毒素并推测其可能的化学结构后,张宗炳等(1983)提出了酪胺是这一神经毒素,他们采用 HPLC 法观察到,正常蜚蠊的血淋巴中也含有少量酪胺,用 DDT 处理后,酪胺的量增加,这一变化显然是由 DDT 诱导产生,但 DDT 是否能诱导酪氨酸脱羧酶的活力,是本文要解决的问题。

放射自显影及液体闪烁测定法都表明,在正常情况下,蜚蠊体内可以产生酪胺,用 DDT 处理后,则酪胺含量增加;其转化途径是通过酪氨酸脱羧酶将酪氨酸脱羧形成酪胺,这一结果与张宗炳等用 HPLC 法所得的结果一致。

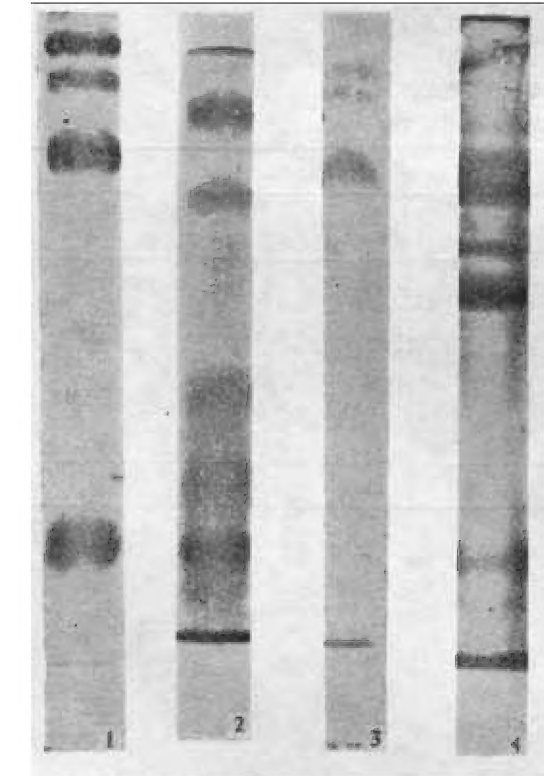


图 6 层析各峰样品的蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.峰 I 2.峰 II 3.峰 III 4.层析前

Figure 6 Polyacrylamide gel electrophoresis of the enzyme proteins of the three peaks

1. Peak I 2 Peak II 3 Peak III 4. Before isolation

实验发现,神经索中酪氨酸脱羧酶的活力高于血淋巴中的酶的活力。酪胺对于神经系统的作用已经肯定,神经毒素能引起昆虫的中毒症状及酪胺的神经电生理实验都证明,酪胺干扰了神经系统的正常功能。至于酪胺对神经系统的作用方式,Evans(1978)曾提

出,酪胺是蜚蠊中枢神经系统“章鱼胺能突触”吸取章鱼胺的最有效竞争性抑制剂,因此,酪胺的积累造成中枢神经系统对章鱼胺吸取的阻滞,引起神经传导受阻而使昆虫死亡。

DDT 对酪氨酸脱羧酶产生的诱导作用,进一步为酪胺作为神经毒素提供了依据,同时,提出了 DDT 对昆虫体内一个新的酶系的诱导作用。

二、DDT 的诱导机制

为了阐明 DDT 的诱导水平,我们参照 Bulger 和 Kupfer (1978a, b) 的工作,在 DDT 处理前加入放线菌素-D 进行试验,结果发现,DDT 的诱导作用即消失(表 2),说明 DDT 对酪氨酸脱羧酶产生的诱导效应,是在 DNA-mRNA 的转录水平上进行的;因而可影响蛋白质的合成和提高酶的活性,加入环己亚胺,诱导效应依然出现,这一现象目前尚无法解释。由于诱导作用可能是引起新的酶合成,为此,我们测定了 DDT 处理组及对照组的脱羧酶的 K_m 值及 V_{max} 值,由图 3 可见,二者的 K_m 值相同,而 V_{max} 不同,可见,DDT 这一诱导效应是通过增加酶的量来提高活力的。

DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应只在体内条件下发生,离体情况下(神经索匀浆)不发生,这可能与细胞膜的整体及膜的受体有关。进一步的研系表明,用 DDT 处理后,血淋巴中 cAMP 的含量增加,并与 DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应相平行,因此认为,DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用可能与 cAMP 有关,cAMP 作为第二信使,解除了对 DNA 的抑制,从而可合成更多的 mRNA 及蛋白质,提高了酪氨酸脱羧酶的活力。

三、DDT 的物理诱导假说

DDT 诱导产生神经毒素有以下几个事实:(1)诱导作用只发生在体内,离体情况下不发生,可见诱导效应依赖于细胞的完整性;(2)六种不同类型的神经毒剂,只有引起神经高度兴奋的三种杀虫药剂(DDT, BHC 及溴氰菊酯)可以引起神经毒素的产生(张宗炳等, 1984);(3)连续的电刺激也可诱导毒素的产生(Sternburg, 1952)。因此,我们认为,DDT 诱导酪氨酸脱羧酶的真正原因可能是物理性的,即物理刺激是真正的诱导剂。

关于酶的物理诱导,目前虽然尚未有人提出。但是,可以想象到,细胞膜上存在的一些受体或离子载体,受到一定的物理因素的作用,如电刺激(以及 DDT 的直接或间接的作用)等,可能改变细胞膜的电性质(膜电位)及通透性,然后引起膜上受体或离子载体的结构改变,转而影响膜上的腺苷酸环化酶,产生 cAMP,导致对酪氨酸脱羧酶的诱导作用。尽管这仅是一种假说,尚待进一步证实,但从中也可得到一些有益的启示。由于 DDT 对多种酶都表现有诱导作用(Bulger 和 Kupfer, 1978a, b; Kacew 等, 1973; Lamartiniere, 1982; Hayaoka 等, 1982),因此,DDT 的物理诱导是可能的。

关于酪胺的进一步代谢问题。在哺乳动物及昆虫中已被发现,酪胺可被 β -羟化酶及单胺氧化酶所降解(Hempel 等, 1966)。进一步弄清酪胺的代谢途径,将有助于对酪胺作为神经毒素所起的作用作出比较完善的了解,这部分工作正在进行中。

参 考 文 献

- 张宗炳、吴士雄、金恒亮 1983 DDT 中毒昆虫释放的神经毒素的鉴定。科学通报 28 (4): 256。
张宗炳、吴士雄、程念胜、姚逸红 1984 昆虫神经毒素的研究: 各种神经毒剂引起毒素的产生。昆虫学报 27 (2): 165-72。

- Bulger, W. H. and D. Kupfer, 1978a Studies on the induction of rat uterine ODC by DDT analogs I. Comparison with Estradiol-17 activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 253—62.
- Bulger, W. H. and D. Kupfer, 1978b Studies on the induction of rat uterine ODC by DDT analogs II. Kinetic characteristics of ODC induced by DDT analogs and Estradiol. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 262.
- Evans, P. D. 1978 Octopamine: A high-affinity uptake mechanism in the nervous system of the cockroach. *J. Neurochem.* 30: 1015—22.
- Hayaoka, T. and W. C. Dauterman, 1982. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly and its effect on toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17: 113—119.
- Hempel, K. and H. F. K. Maennl, 1966 Formation of tyramine-³H from tyrosine-³H in various chicken and cat tissues *in vivo*. *Arch. Pharmacol. exptl pathol.* 254(5): 448—60.
- Hopkins, T. L. and L. L. Murdock, 1976 Dopa and tyrosine decarboxylase activity in tissues of cockroach in relation to cuticle formation and ecdysis. *J. Insect. Physiol.* 22: 1167—71.
- Kacew, S. and R. L. Singhal, 1973 The influence of p,p'-DDT etc., on hepatic and renal carbohydrate metabolism and cyclic AMP-adenyl system. *Life Sci.* 13: 1363—71.
- Lamartiniere, C. A. 1982 Altered imprinting rat liver MAO by O,P'-DDT and methoxychlor. *Biochem. Pharma.* 31(5): 647—51.
- Murdock, L. L. and R. A. Wirtz, 1973 Dopa decarboxylase activity in arthropod nervous system. *Biochem. J.* 132: 681—8.
- Sternburg, J. and C. W. Kearns, 1952 The presence of toxin other than DDT in the blood of DDT-poisoned roach. *Science* 116: 144—7.
- Sternburg, J. 1964 Some chemical characteristics of a DDT-induced neuroactive substance from cockroaches and crayfish. *J. Econ. Entomol.* 57(2):241.

STUDIES ON INSECT NEUROTOXIN: DDT INDUCTION OF TYROSINE DECARBOXYLASE IN THE AMERICAN COCKROACH

LUO YUAN NI YI-SHENG J. T. CHANG*

(Department of Biology, Beijing University)

It was previously reported that the neurotoxin released by DDT prostrate cockroaches (*Periplaneta americana*) was identified to be tyramine. Presumably tyramine originates from decarboxylation of tyrosine. The induction of tyrosine decarboxylases by DDT was confirmed in the present work, using ³H-tyrosine, incubated with hemolymph or nerve cord homogenates respectively and determined by liquid scintillation and autoradiography. The induction by DDT is controlled at transcriptional level, since injection of Actinomycin-D prior to DDT treatment completely abolishes the induction effect. The induction of tyrosine decarboxylase is accompanied with an increase of cAMP. However, induction only occurs *in vivo*, not *in vitro*. Based on the fact that continuous electrical stimulation also induces the production of the neurotoxin and the result of present observations, a theory of the physical induction of enzyme was hereby proposed.

Key words neurotoxin—tyrosamine—*Periplaneta americana*—tyrosine decarboxylase—cAMP

* Please correspond with the senior author, J. T. Chang for reprints.